



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 32 139.6

Anmeldetag: 4. Juli 2002

Anmelder/Inhaber: Technische Universität Dresden, Dresden/DE

Bezeichnung: Mit Nukleinsäuren und Nukleinsäurederivaten beschichteter metallischer Gegenstand, Verfahren zu dessen Herstellung und dessen Verwendung

IPC: C 07 H, A 61 K, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 29. Juli 2003
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident
Im Auftrag

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Stech

BEST AVAILABLE COPY

Zusammenfassung

Ein metallischer Gegenstand mit einer Metalloxidschicht und einer durch anodische Polarisierung darin stabil verankerten Nukleinsäurebeschichtung. Die Beschichtung kann durch Hybridisierung von komplementären Strängen und an letztere gebundene Wirkstoffmoleküle an verschiedenste Anwendungen angepasst werden. Derart beschichtete Metalle können, unter anderem, für Implantatmaterialien in der Medizin verwendet werden.

Mit Nukleinsäuren und Nukleinsäurederivaten beschichteter metallischer Gegenstand, Verfahren zu dessen Herstellung und dessen Verwendung

Die Erfindung betrifft einen metallischen Gegenstand mit einer stabilen Beschichtung aus Nukleinsäuren und/oder Nukleinsäurederivaten und ein Verfahren zur Herstellung genannter Beschichtung. Durch die Kopplung von Wirkstoffen an die Nukleinsäuren und/oder Nukleinsäurederivate kann die Beschichtung an verschiedenste Anwendungen angepasst und die Biokompatibilität mit entsprechend modifizierten Oberflächen erhöht werden. Derartig beschichtete Metalle sind interessant für die Medizin und Tiermedizin; z. B. für Implantate, aber auch für verschiedenste Bereiche der Biotechnologie.

Eine effiziente Immobilisierung von Nukleinsäuren und Nukleinsäurederivaten auf festen Trägermaterialien ist von großer Bedeutung für viele Bereiche der Biotechnologie.

So sind Verfahren zur Immobilisierung von Nukleinsäuren auf Glas, z.B. zur Herstellung von Nukleinsäurearrays, sowie zur Immobilisierung auf Goldpartikeln (US 6291188 B1, EP 1170374 A1) z. B. für den Gentransfer bekannt. Die Immobilisierung auf Goldpartikeln geschieht dabei entweder durch Adsorption (EP 1170374 A1) oder über einen Schwefellinker (US 6291188 B1).

Des weiteren sind Verfahren zur Adsorption von Nukleinsäuren an Zirkonium(IV)-oxid und Aluminiumoxid und anderen Metalloxiden beschrieben (DE 4309248 A1, EP 0391 608 A2, WO 92/18514 A1). Um diese Adsorption an oben genannte Metalloxide zu gewährleisten, muss das Material allerdings zu mindestens 50%, vorzugsweise 99% aus Metalloxid bestehen (EP 0391 608 A2, Seite 4, Zeilen 18 - 29).

Für zahlreiche Anwendungen ist eine orientierte, reproduzierbare, dauerhafte, feste, chemikalien- und temperaturresistente Verbindung der Nukleinsäuren und/oder Nukleinsäurederivate mit der Metalloberfläche wünschenswert. Dies sind Eigenschaften, die durch eine simple Adsorption nicht sicher gewährleistet werden können.

Beschrieben sind auch Verfahren zur Bindung von Oligonukleotiden an Ventilmetallen, wie silanisiertes Tantal (Bier, FF und Scheller, FW. 1996. Biosensors & Bioelectronics 11:669-674) und silanisiertes Titan (Bier, FF et al. 1999. Biotechniques 27:752-760). Um die für diese Verfahren notwendige Silanisierung der Metalloberfläche zu erreichen, muss das Metall unter aggressiven chemischen Bedingungen vorbehandelt werden (s. auch Xiao, SJ et al. 1998. Langmuir 14:5507-5516). Nachteilig bestehen diese Verfahren aus mindestens drei Schritten. Zusätzlich müssen auch die Nukleinsäuren dazu aufwendig modifiziert werden.

Bekannt sind Methoden, die eine feste Verbindung von organischen Molekülen, wie z. B. Collagen, auf Ventilmetalloberflächen gewährleisten (DE 19643555). Auf solchen Metallen bzw. Legierungen ausgebildete Oxidschichten weisen zumindest bei anodischer Polarisierung Ionenleitung auf und erlauben damit über anodische Polarisierung eine Variation der Oxidschichtdicke in weiten Grenzen. Dazu wird das Phänomen ausgenutzt, dass bei anodischer Polarisierung in wässrigen Lösungen die bereits vorhandene Oxidschicht auf Titanwerkstoffen durch Wanderung von Ionen im elektrischen Feld zu wachsen beginnt. In diese wachsende Schicht können an der Oberfläche, z. B. durch Adsorption, vorhandene Moleküle oder funktionelle Gruppen in die Oxidschicht eingebaut werden. Der orientierte Einbau und damit der Erhalt von bestimmten Eigenschaften/Funktionen der Substanzen dabei erweist sich oft jedoch als schwierig.

Von anorganischen Anionen, vor allem von Phosphat, ist bekannt, dass sie in solche anodisch wachsende Titan(IV)oxid-Schichten eingebaut werden können. Dabei kann das Anion unter Umständen auch als funktionelle Gruppe ein Teil von größeren Molekülen sein (DE19643555). Damit das die anionischen Gruppen tragende Molekül in die anodischen Oxidschichten eingebaut wird, müssen die elektrostatischen Ladungsverhältnisse zwischen Oberfläche und adsorbierendem Molekül(teil) eine primäre Adsorption zulassen.

Negativ-geladene Moleküle, wie Nukleinsäuren, werden allerdings von der, unter physiologischen Bedingungen negativ-geladenen, Titan-Titan(IV)oxid-

Oberfläche abgestoßen. Die in DE19643555 beschriebene Methode ist aus diesem Grunde nicht auf Nukleinsäuremoleküle anwendbar.

Ein genereller Nachteil, der bisher in Medizin, Biologie und Chemie verwendeten, chemisch oder biochemisch modifizierten Oberflächen ist der Mangel an Variabilität und Modularität. Einmal aufgebrachte Substanzen verbleiben vielfach irreversibel an den Oberflächen oder weisen eine nur bedingt einstellbare Freisetzungskinetik auf. Zudem muss das Beschichtungsverfahren meist aufwendig an die gewünschte Beschichtung angepasst werden. Eine Anpassung der Beschichtung durch den Anwender an seine Einsatzzwecke ist dadurch nahezu unmöglich.

Die Aufgabe der Erfindung ist es, einen metallischen Gegenstand mit einer stabilen Beschichtung aus Nukleinsäuren und/oder Nukleinsäurederivaten zu schaffen, bei dem die Nukleinsäuren für weitere Reaktionen, wie z. B. Hybridisierungen optimal zugänglich sind.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe gelöst durch einen Gegenstand aus Metall, dessen Oberfläche mit einer dünnen Metalloxidschicht überzogen ist, in welche terminale Molekülbereiche von Nukleinsäuren stabil eingebaut sind.

Dabei wird eine frei bewegliche Orientierung der nicht-eingebauten Bereiche der Nukleinsäuren zur Metalloberfläche erreicht. Durch die freie Beweglichkeit sind die nicht eingebauten Bereiche der Nukleinsäuren für anschließende Prozesse, wie eine Hybridisierung mit einem komplementären Strang, optimal zugänglich.

Erfindungsgemäß tragen die eingebauten 5'- oder 3'-terminalen Bereiche der Nukleinsäuren anionische Gruppen, vorzugsweise Phosphat, Phosphonat oder Sulfonat.

Der Begriff Nukleinsäure schließt im Sinne dieser Beschreibung Desoxyribonukleinsäuren (DNA), Ribonukleinsäuren (RNA) und Peptidische Nukleinsäuren (PNA), sowie auch alle aus diesen Grundstrukturen ableitbaren Modifikationen wie z. B. Phosphothioate, Phosphoramidate, O-Methyl-Derivate und locked nucleic acids (LNA) ein. Die Nukleinsäuren können dabei Einzelstränge, Doppelstränge oder daraus gemischte Strukturen sein. Vorzugsweise ist auch bei einer Beschichtung mit doppelsträngiger DNA nur ein Nukleinsäurestrang fest mit der Metalloberfläche verbunden.

Der metallische Gegenstand besteht vorzugsweise aus einem Ventilmaterial, wie z. B. Aluminium, Titan, Tantal, Zirkonium, Niob oder deren Legierungen, einschließlich intermetallischer Phasen.

Die Sequenzen der an den 5'-Termini immobilisierten Nukleinsäuren werden vorteilhaft so ausgewählt, dass die für anschließende Prozesse, wie z. B. Hybridisierung, relevanten Sequenzen auch bei einem Schichtwachstum von über 2 nm noch zugänglich sind. Die Sequenzen in der direkten Nähe des 5'-Termini sind dabei beliebig, da diese in die Oxidschicht eingebaut werden. Wohingegen die Sequenzen in der Nähe der freibeweglichen 3'-Termini, vorteilhaft spezifische Erkennungssequenzen, z. B. für eine anschließende Hybridisierung mit komplementären Strängen, enthalten können.

Gleiches gilt entsprechend für über die 3'-Termini-immobilisierten Nukleinsäuren.

An dem erfindungsgemäßen metallischen Gegenstand, an dessen Oberfläche einzelsträngige Nukleinsäuren immobilisiert sind, können über komplementäre Basenpaarung komplementäre Nukleinsäure-Einzelstrangmoleküle gebunden sein. Die Sequenz des immobilisierten Stranges bestimmt dabei, welche Sequenz(en) an diesen komplementär binden können.

Erfindungsgemäß können an die komplementär-bindenden Nukleinsäurestränge verschiedenste biologische oder chemische Wirkstoffe kovalent

gebunden sein. Vorteilhaft werden dabei die biologischen bzw. chemischen Eigenschaften der entsprechend modifizierten Oberfläche weitgehend von den an die Nukleinsäuren gekoppelten Wirkstoffen bestimmt.

Die Bindung der komplementären Stränge kann vorteilhaft auch vom Anwender durchgeführt werden. Durch die Auswahl komplementärer Stränge mit geeigneten Wirkstoffen kann der Anwender die biologischen bzw. chemischen Eigenschaften der Metalloberfläche an die Bedürfnisse, die seine spezielle Anwendung erfordert, anpassen.

Die Modularität dieses Systems garantiert demnach eine nahezu uneingeschränkte Variabilität beim Aufbau „biologisierten“ Oberflächen.

Die Wirkstoffe sind beispielsweise anorganische oder organische oder biochemische Moleküle oder Zell- oder Gewebekomponenten.

Dabei können, ausgehend von einem metallischen Gegenstand, der mit einzelsträngigen Nukleinsäuren beschichtet ist, die biologischen Eigenschaften der Oberfläche durch folgende Faktoren vielseitig variiert werden.

- Die Sequenzen der immobilisierten Stränge bestimmen, welche Nukleinsäuresequenzen komplementär binden können.
- Die Stabilität der Bindung zwischen immobilisierten und komplementären Strängen bestimmt das Freisetzungsverhalten und die resultierende Bioverfügbarkeit an letzterer gebundener Wirkstoffe.
- An immobilisierte Stränge mit gleicher Sequenz können verschiedene Wirkstoffe tragende komplementäre Stränge binden.
- Auf den immobilisierten Strängen können lateral definiert oder statisch verteilt verschiedene Nukleinsäuren gleichzeitig immobilisiert werden, bei gleicher Flexibilität in der Gestaltung der in den drei Punkten zuvor beschriebenen Eigenschaften.

- Durch die variable Gestaltung der Hybridstabilität auf ein und derselben Oberfläche kann das Freisetzungsverhalten der assoziativ gebundenen und Wirkstoff-tragenden komplementären Nukleinsäuren gesteuert werden.
- Durch Modifizierung der Basen, wie beispielsweise Inosin, bzw. des Rückgrats der Nukleinsäuren, wie beispielsweise ein Peptid-, Phosphothioat- oder Methylphosphonat-Rückgrat, kann die chemische Stabilität und die Stabilität gegenüber dem Abbau durch Nukleasen, gezielt beeinflusst werden. Die oben genannten Eigenschaften werden dadurch nicht maßgeblich beeinträchtigt.
- Die Sequenz der immobilisierten Nukleinsäuren kann spezielle Erkennungssequenzen für Antikörper, Nukleinsäure-bindende Proteine oder Nukleasen enthalten.

Die Stabilität der Bindung zwischen immobilisierten und komplementären Strängen ist dabei im wesentlichen abhängig von der Länge des Hybridbereiches, dessen G-C-Gehalt und der Anzahl von sogenannten "Mismatches", d. h. nicht komplementären Basenpaaren. Dabei steigt die Stabilität mit dem G-C-Anteil, durch eine größere Zahl von Wasserstoffbrücken (G-C-Paare: 3 Wasserstoffbrücken/ A-T-Paare: 2 Wasserstoffbrücken). Mismatch-Paare bilden keine Wasserstoffbrücken aus, da sie nicht komplementär sind. Je größer die Zahl der Mismatches, desto instabiler das Hybrid.

Ist die Freisetzung der komplementären Stränge und der an diese gekoppelten Wirkstoffe nicht erwünscht, kann diese vorteilhaft durch kovalente Bindung des komplementären Strangs an den immobilisierten verhindert werden. Eine solche kovalente Bindung wird z. B. durch Vernetzung mit UV-Licht oder chemische Reaktionen erreicht.

Ist eine besonders schnelle Freisetzung der, an die komplementären Stränge gebundenen, Wirkstoffe in einem biologischen Milieu erwünscht, kann dies durch den Einbau von Erkennungssequenzen für Nukleasen erreicht werden.

Vorteile des erfindungsgemäß beschichteten Gegenstandes sind insbesondere:

- Stabilität der Nukleinsäure-Beschichtung,
- Durch die Orientierung der Nukleinsäuren, optimale Zugänglichkeit für anschließende Prozesse, wie beispielsweise Hybridisierung,
- Möglichkeit zur variablen und modularen Modifizierung der Metalloberfläche durch Binden von komplementären Strängen und an diese gebundene Wirkstoffe,
- Möglichkeit der Beeinflussung des Freisetzungsverhaltens und damit der Bioverfügbarkeit der Wirkstoffe durch die molekulare Struktur des Nukleinsäure-Hybrids,
- Möglichkeit der einfachen Anpassung der Beschichtung durch den Anwender.

Erfindungsgemäß wird der mit Nukleinsäuren beschichtete metallische Gegenstand durch ein Verfahren hergestellt, bei dem die an mindestens einem terminalen Molekülbereich anionische Gruppen tragenden Nukleinsäuren mit dem metallischen Gegenstand so in Kontakt gebracht werden, dass diese auf der Metalloxidoberfläche vorliegen. Parallel dazu oder anschließend wird der metallische Gegenstand anodisch in einer Elektrolytlösung polarisiert. Durch anodische Polarisation wird eine mehrschichtige Oxidschicht erzeugt, in deren äußere Schicht die anionischen Gruppen tragenden terminalen Molekülbereiche der Nukleinsäuren eingebaut werden.

Überraschend wurde festgestellt, dass eine terminale Modifikation der Nukleinsäuren mit anionischen Gruppen geeigneten pK_s -Wertes die Immobilisierung von Nukleinsäuren ermöglicht. Dabei bestehen die anionischen Gruppen aus Molekülstrukturen, die bei dem pH-Wert und der Ionenstärke des Verfahrens eine negative Ladung besitzen. Vorzugsweise sind die anionischen Gruppen Phosphat- oder Phosphonat- oder Sulfonatgruppen. Die Verbindung der anionischen Gruppen mit den terminalen Molekülbereichen erfolgt vorzugsweise kovalent an den 3'- oder 5'-Termini.

Vorteilhaft sind terminal phosphorylierte Oligonukleotide kommerziell erhältlich. Erfindungsgemäß beginnt der Einbau der Nukleinsäuren an der terminalen anionischen Gruppe und wird im wesentlichen durch diese bestimmt. Im Unterschied zu terminalen Phosphatgruppen sind die Phosphatgruppen des Nukleinsäurerückgrats nicht geeignet, einen Einbau in die Metalloxidschicht zu initiieren (siehe Ausführungsbeispiel 4). Die Phosphatgruppen im DNA-Rückgrat können somit durch andere Bindungstypen, wie z. B. Peptid, Phosphothioat, Methyl-Phosphonat oder andere ersetzt werden.

Erfindungsgemäß werden die Bedingungen für die Immobilisierung so gewählt, dass die anionischen Gruppen noch mindestens eine negative Ladung tragen, während die Metall-Metalloxid-Oberfläche zumindest einige lokal positive Ladungszentren aufweist. Bei diesen Bedingungen wird eine elektrostatisch-initiierte adsorptive Anlagerung der terminalen Bereiche der Nukleinsäuren ermöglicht.

Erfindungsgemäß erfolgt die adsorptive Anlagerung und der anschließende Einbau durch anodische Polarisierung bei pH 3 bis 6, vorzugsweise bei pH 4 in Acetatpuffer.

Das Wachstum der Oxidschicht kann durch die Wahl der elektrochemischen Parameter, vorzugsweise Potenzial, Stromdichte und Potenzialänderungsgeschwindigkeit kontrolliert werden. Dabei bestimmen die elektrochemischen Parameter die auftretende und die Größe der Moleküle die zulässige Tiefe des Einbaus.

Erfindungsgemäß wird dabei das erreichte Potenzial auf einen Wert zwischen 2 und 200 V_{SCE} begrenzt, der das Wachstum der Oxidschicht in einen, z. B. für eine spätere Hybridisierung, notwendigen Erkennungsbereich der Nukleinsäure verhindert.

Nach der Immobilisierung wird die erzeugte Matrix mit Puffer (pH \approx 4) und destilliertem Wasser gespült. Die Probe kann sofort weiterverarbeitet oder getrocknet bei kühlen Temperaturen (<10°C) unter Lichtausschluss gelagert werden.

Überraschend ergibt sich als Resultat der erfindungsgemäßen Immobilisierung eine freie Beweglichkeit der nicht-eingebauten Abschnitte der immobilisierten Nukleinsäurestränge. Dadurch ist der nicht-eingebaute Teil der Nukleinsäure für anschließende Prozesse, wie eine Hybridisierung mit einem komplementären Strang, optimal zugänglich.

Für eine mögliche anschließende Hybridisierung von komplementären Nukleinsäuresträngen an das mit einzelsträngigen Nukleinsäuren beschichtete Metall müssen die Bedingungen so gewählt werden, dass eine bestmögliche Wechselwirkung und damit Hybridisierung zwischen den immobilisierten und den in Lösung befindlichen Einzelsträngen stattfindet.

Für die Hybridisierung werden der pH-Wert und die Ionenstärke so gewählt, dass sowohl die Metall-Metalloxid-Oberfläche, als auch das Nukleinsäure-Rückgrat, negativ geladen sind und somit eine elektrostatische Abstoßung zwischen dem DNA-Rückgrat und dem Metall erreicht wird. Im Falle von Nukleinsäurederivaten mit ungeladenem Rückgrat werden die Bedingungen so gewählt, dass die Metalloberfläche negativ geladen ist. Durch die Abstoßung vom Metall wird eine freibewegliche Orientierung der immobilisierten Stränge unterstützt und eine unspezifische Adsorption der komplementären Stränge vermieden.

In Abhängigkeit von Länge und Basenzusammensetzung der zu hybridisierenden Sequenzen wird ein Puffersystem geeigneter Ionenstärke, üblicherweise im Bereich zwischen 0,1 und 1,5 mol/Liter an einwertigen Kationen gewählt. Der pH-Wert liegt erfindungsgemäß zwischen 4 bis 10, vorzugsweise zwischen 7,0 und 7,5. In der Pufferlösung befinden sich die Komplementärstränge, die mit anorganischen oder organischen, vorrangig bioaktiven, Gruppen oder Molekülen kovalent modifiziert sind.

Für die Hybridisierung wird die, mit einzelsträngigen Nukleinsäuren beschichtete, Substratoberfläche zwischen 10 Minuten und 2 Stunden inkubiert und anschließend mit Pufferlösung und Wasser gespült.

Vorteilhaft sind die Bedingungen der Hybridisierung milde und können so gewählt werden, dass sie nahezu physiologischen Bedingungen entsprechen. Dadurch wird eine bestmögliche molekulare und funktionelle Unversehrtheit von biologischen Wirkstoffen, die an die komplementären Stränge gebunden sind, gewährleistet.

Der so beschichtete Gegenstand kann, falls keine unmittelbar anschließende Verwendung erfolgt, bei kühlen Temperaturen ($<10^{\circ}\text{C}$) und unter Lichtausschluss gelagert werden.

Vorteilhaft kann die Hybridisierung und damit die Beschichtung mit den gewünschten Wirkstoffen kurz vor der Verwendung durch den Anwender erfolgen. Dies ermöglicht eine bestmögliche Flexibilität und kurzfristige Entscheidungen in der Wahl der Wirkstoffe, sowie eine getrennte Lagerung von metallischem Gegenstand und Wirkstoffen.

Die Kopplung von Wirkstoffen an die Nukleinsäuren kann über an die Nukleinsäuren terminal gebundene funktionelle Gruppen, wie beispielsweise Aminoalkyl-, oder Mercaptoalkylgruppen, erfolgen (s. Agrawal, S. (Editor). 1994. Methods in Molecular Biology 26: Protocols for Oligonucleotide Conjugates, Humana Press Inc., Totowa, NJ). Mit solchen funktionellen Gruppen, wie beispielsweise Aminoethyl-, modifizierte Nukleinsäuren sind kommerziell erhältlich. Mit ebenfalls kommerziell erhältlichen Crosslinkern können Wirkstoffe über diese funktionellen Gruppen an die Nukleinsäuren gebunden werden. Kommerziell erhältlich sind auch mit Biotin terminal-modifizierte Nukleinsäuren. An letztere können Avidin- oder Streptavidin-konjugierte Wirkstoffe binden.

Weitere Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens sind:

- Stabile Immobilisierung von Nukleinsäuren,
- auch auf Nukleinsäurederivate anwendbar,
- nur ein Verfahrensschritt für die Immobilisierung der Nukleinsäuren,
- Kontrollierbarkeit, Reproduzierbarkeit,

- keine toxischen Chemikalien nötig,
- kostengünstige und einfache Fertigung,
- orientierter terminaler Einbau der Nukleinsäuren.

Nukleinsäurebeschichtete Metalle sind interessant für die Medizin und Tiermedizin, z. B. für Implantate, aber auch für verschiedenste Bereiche der Biotechnologie und Sensorik.

Bei einer Anwendung des erfindungsgemäß beschichteten metallischen Gegenstands für den Einsatz für Implantate in der Medizin, erlauben die genannten Variationsmöglichkeiten die alternative oder gleichzeitige Beschichtung des Implantats mit Substanzen unterschiedlicher biologischer Wirksamkeit, wie beispielsweise Zytokinen, Botenstoffen, Antikörpern.

Vorteilhaft kann das Freisetzungsverhalten dieser Wirkstoffe durch Variationen in der Hybridstabilität beeinflusst werden. Die gleichzeitige oder zeitlich versetzte Freisetzung eines oder mehrerer Wirkstoffe von ein und derselben Oberfläche sind dadurch möglich.

Eine denkbare medizinische Anwendungsmöglichkeit ist die osteoinduktive Ausrüstung einer Implantatoberfläche für Knochenkontakt mit dem 'bone morphogenetic protein' Typ 4 (BMP-4) als an die Nukleinsäuren gekoppeltem Wirkstoff.

Eine andere Anwendungsmöglichkeit ist die Beschichtung der Implantatoberfläche mit dem Zellproliferation und -differenzierung positiv beeinflussenden Wachstumsfaktor TGF- β (tissue growth factor beta) als an die Nukleinsäuren gekoppeltem Wirkstoff.

Anhand nachfolgender Ausführungsbeispiele wird die Erfindung näher erläutert. Eine Ausführungsvariante der erfindungsgemäßen Lösung wird in Ausführungsbeispiel 2 erläutert. Ausführungsbeispiele 1 und 3 sind Negativ-Beispiele.

Die in den folgenden Ausführungsbeispielen verwendeten DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma SIGMA-ARK GmbH Darmstadt bezogen und haben folgende Sequenzen:

T3E-5P: $^{2-}\text{O}_3\text{PO}-5'-\text{CCA AAC CCG TCA ATC AAG TCT ACA CTG TTC}-3'$

S3E-FI: Fluorescein-HN- $(\text{CH}_2)_6-5'-\text{CAG TGT AGA CTT GAT}-3'$

Ausführungsbeispiel 1:

Eine zylindrische Probe aus TiAl6V4 mit einem Durchmesser von 10 mm und einer Dicke von 3mm wird geschliffen, oxidpoliert und mit Ethanol gewaschen.

Eine 40 nmol/Liter Lösung von S3E-FI DNA in sterilem TRIS-HCl-Puffer (50 mmol/Liter; pH = 7,5) wird bei 95°C denaturiert und für mindestens 5 min auf Eis gestellt.

Mit 3 ml der so vorbereiteten Lösung wird die Probe 1 h inkubiert und anschließend einmal mit TRIS-HCl-Puffer (50 mmol/Liter; pH = 7,5) und zweimal mit 3 ml sterilem Wasser gespült und steril und staubfrei luftgetrocknet.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop kann bei einer so behandelten Probe keine Fluoreszenz nachgewiesen werden.

Ausführungsbeispiel 1 zeigt, dass Nukleinsäuren durch Adsorption nicht nachweisbar auf einer TiAl6V4-Oberfläche immobilisiert werden.

Ausführungsbeispiel 2:

Eine metallische Probe aus TiAl6V4 wird, wie in Ausführungsbeispiel 1 beschrieben, vorbehandelt und als Substratelektrode in eine Drei-Elektroden-Anordnung mit einer Silber/ Silberchloridelektrode als Bezugslektrode und einer Platin-Gegenelektrode in ein Well einer Zellkulturschale eingebracht. Eine 400 nmol/Liter Lösung der 5'-phosphorylierten T3E-5P DNA in sterilem TRIS-HCl-Puffer (50 mmol/Liter; pH = 7,5) wird bei 95°C denaturiert und für mindestens 5 min auf Eis gestellt.

Nach dem Anschluss aller Elektroden an die Potenziostat-Galvanostat-Einheit werden 3 ml der vorbereiteten DNA-Lösung in das Well der Zellkulturschale gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wird die TiAl6V4-Probe mit einer Stromdichte von $76 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ für 2 Minuten anodisch polarisiert. Das Potenzial wird auf maximal 10V gegenüber der Ag/AgCl-Bezugselektrode begrenzt. Wird dieser Wert erreicht, so wird die Immobilisierung vorzeitig gestoppt.

Nach Abschluss der elektrochemischen Polarisation wird die Zellkulturschale mit der Titanprobe mit 3 ml sterilem Acetatpuffer (0,2 mol/Liter; pH = 4,0) und anschließend zweimal mit 3 ml sterilem Wasser gespült.

Die Probe wird anschließend wie in Ausführungsbeispiel 1 beschrieben mit der, zum 3'-Terminus der T3E-5P DNA komplementären, S3E-FI DNA inkubiert und gewaschen.

Bei einer so behandelten Probe zeigt sich in der Fluoreszenzmikroskopie eine starke Fluoreszenz im grünen Wellenlängenbereich auf der Metalloberfläche. Dies belegt eine erfolgreiche, stabile Immobilisierung der 5'-phosphorylierten T3E-5P DNA an der metallischen Oberfläche, sowie eine erfolgreiche Hybridisierung mit der komplementären S3E-FI DNA.

Ausführungsbeispiel 3:

Die Durchführung entspricht Ausführungsbeispiel 2 mit dem Unterschied, dass zur anodischen Polarisation anstelle der 5'-phosphorylierten T3E-5P DNA eine Lösung der nicht phosphorylierten S3E-FI DNA verwendet wird.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop kann bei einer so behandelten Probe keine Fluoreszenz nachgewiesen werden. Um zu ermitteln, ob die fehlende Fluoreszenz auf einen zu tiefen Einbau der Fluoresceinmoleküle in die Oberfläche zurückzuführen ist, wurde die Zusammensetzung der auf der Probenoberfläche gebildeten Oxidschicht mit Photoelektronenspektroskopie (XPS) analysiert. Bis in eine Tiefe von 5 nm konnte dabei kein Phosphor

nachgewiesen werden. Der negative Phosphor-Nachweis zeigt, dass keine Nukleinsäure gebunden wurde.

Aus den Ausführungsbeispielen geht hervor, dass

- Nukleinsäuren durch Adsorption nicht nachweisbar auf einer TiAl6V4-Oberfläche immobilisiert werden,
- 5'-phosphorylierte Nukleinsäuren durch anodische Polarisation bei pH 4,0 stabil auf einer TiAl6V4-Oberfläche immobilisiert werden und die Termini frei zugänglich für anschließende Hybridisierungen sind..
- Nukleinsäuren, die nicht terminal phosphoryliert sind, durch anodische Polarisation bei pH 4,0 nicht nachweisbar auf einer TiAl6V4-Oberfläche immobilisiert werden.

Patentansprüche:

1. Gegenstand aus Metall mit einer dünnen Metalloxidschicht, in welche 5'- oder 3'-terminale Molekülbereiche von Nukleinsäuren stabil eingebaut sind.
2. Gegenstand nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die nicht-eingebauten Bereiche der Nukleinsäuren freibeweglich sind.
3. Gegenstand nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die eingebauten 5'- oder 3'-terminalen Bereiche der Nukleinsäuren anionische Gruppen tragen.
4. Gegenstand nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die anionischen Gruppen Phosphat- oder Phosphonat- oder Sulfonatgruppen sind.
5. Gegenstand nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Metall aus einem Ventilmetall oder einer Ventilmetallegierung besteht.
6. Gegenstand nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Metall aus Aluminium oder Titan oder Tantal oder Zirkonium oder Niob oder einer Legierung, einschließlich intermetallischer Phasen, eines oder mehrerer dieser Metalle besteht.
7. Gegenstand nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuren Desoxyribonukleinsäuren (DNA) oder Ribonukleinsäuren (RNA) oder Peptidische Nukleinsäuren (PNA) oder Locked Nucleic Acids (LNA) oder gemischte Moleküle aus diesen sind.

8. Gegenstand nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuren zusätzliche Modifikationen des Zucker-Phosphat-Rückgrates, wie Phosphothioat- oder O-Methyl-gruppen, und/oder unkonventionelle Basen, wie Inosin, enthalten.
9. Gegenstand nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass an den Einzelsträngen komplementäre Nukleinsäurestränge durch komplementäre Basenpaarung gebunden sind.
10. Gegenstand nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass an die komplementären Nukleinsäurestränge Wirkstoffe, wie anorganische oder organische oder biochemische Moleküle oder Zell- oder Gewebekomponenten gebunden sind.
11. Gegenstand nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass der an der Metalloberfläche immobilisierte und der komplementäre Strang kovalent verbunden sind.
12. Verfahren zur Herstellung eines mit Nukleinsäuren beschichteten Gegenstands mit einer dünnen Metalloxidschicht, dadurch gekennzeichnet, dass der metallische Gegenstand mit Nukleinsäuren, die an mindestens einem terminalen Molekülbereich anionische Gruppen tragen, in Kontakt gebracht wird, so dass diese auf der Metalloxidoberfläche vorliegen, und parallel dazu oder anschließend anodisch in einer Elektrolytlösung polarisiert wird.
13. Verfahren nach Anspruch 12 dadurch gekennzeichnet, dass es bei einem pH-Wert und einer Ionenstärke durchgeführt wird, bei denen die anionischen Gruppen negativ geladen sind und die Metall-Metalloxidschicht zumindest lokal einige positive Ladungszentren aufweist.

14. Verfahren nach Anspruch 13 dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert im Bereich zwischen 3,0 und 5,0 liegt.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass das erreichte Potenzial auf einen Wert zwischen 2 und 200 V_{SCE} begrenzt wird, der das Wachstum der Oxidschicht in einen für andere Prozesse notwendigen Erkennungsbereich der Nukleinsäure verhindert.
16. Verfahren zur Immobilisierung von komplementären Nukleinsäuren an einen Gegenstand nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert und die Ionenstärke so gewählt werden, dass die Metall-Metalloxidoberfläche negativ geladen und das Nukleinsäure-Rückgrat negativ geladen oder ungeladen ist.
17. Verfahren nach Anspruch 16 dadurch gekennzeichnet, dass es bei einer Ionenstärke im Bereich von 0,1 bis 1,5 mol/Liter und der pH-Wert im Bereich von pH 7,0 bis 7,5 liegen.
18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, dass an die komplementären Nukleinsäurestränge Wirkstoffe, wie anorganische oder organische oder biochemische Moleküle oder Zell- oder Gewebekomponenten gebunden sind.
19. Verwendung eines Gegenstandes nach einem der Ansprüche 1 bis 11 als Material für Implantate in der Medizin.